

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT/PT99/00015

ESU



PORTUGAL

MINISTÉRIO DA ECONOMIA

REC'D 27 AUG 1999
WIPO PCT

PT99/00015

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

**CERTIFICADO DE PEDIDO
DE PATENTE DE INVENÇÃO**

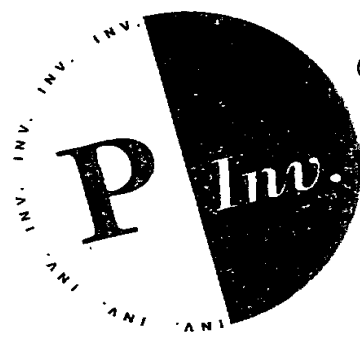
Certifica-se que os documentos em anexo estão conforme o original do pedido de patente de invenção nº. 102197.

O pedido foi apresentado no INPI no dia 21 de Agosto de 1998.

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Lisboa, 18 de Agosto de 1999.



*Pelo Presidente
do Instituto Nacional da Propriedade Industrial*



**INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

Campo das Cebolas
1100 LISBOA
Telef.: (01) 888 51 51/2/3 - Fax: (01) 887 53 08 - 886 00 66
E-mail : inpi @ mail. telepac. pt



DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 LINHA AZUL 888 10 78
TELEFAX: 87 53 08

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	Classificação Internacional (51)
N.º 102197 (11) Data do pedido: 21/08/98 (22)					
Requerente(s) (71): (Nome e Morada) Código Postal () Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial / Instituto de Biotecnologia, Química Fina e Tecnologia Alimentar, português, com sede na Estrada do Paço do Lumiar, 1699 Lisboa Codex, Portugal					
Inventores (72): Maria Eugénia Meirinhos da Cruz, residente na Rua Maestro Raul Ferrão n.º 43, 1500 Lisboa; Manuela Colla Carvalheiro, residente na Av. Almirante Reis n.º 62 - G, 4.º, 1150 Lisboa; João Carlos Santana Jorge, residente na Rua Acúrsio Pereira n.º 8, r/c A, Olivais Sul 1800 Lisboa					
Reivindicação de prioridade(s) (30)				Figura (para interpretação do resumo)	
Data do pedido	Pais de Origem	N.º de pedido			
Epígrafe: (54) "FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS DE DINITROANILINAS E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"					
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) A invenção refere-se a formulações lipossomais contendo uma ou várias dinitroanilinas, variando a dimensão dos lipossomas de 50 µm a 0,01 µm e sendo as eficácias de encapsulação tipicamente superiores a 30 %. As dinitroanilinas lipossomais, quando administradas a animais, não apresentam toxicidade aguda ou diminuem significativamente a toxicidade da respectiva fórmula livre e são eficazes no combate a infecções por protozoários ou outros microorganismos. A invenção refere-se ainda a um processo para a preparação de formulações lipossomais que compreende prepararem-se lipossomas multilamelares contendo a dinitroanilina e se submeterem os lipossomas a liofilização, reidratação e, opcionalmente, a execução de um passo de dimensionamento antes do passo de liofilização. A liofilização faz-se na presença de crioprotectores destinados a evitar a sublimação e consequente perda do medicamento nesse passo. A invenção refere-se ainda a formulações lipossomais de dinitroanilinas contendo uma mistura de partículas que após dimensionamento apresentem populações de diâmetro, respectivamente, superior e inferior a 100 nm.					



DESCRIÇÃO

"FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS DE DINITROANILINAS E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"

Domínio da Invenção

Esta invenção refere-se a formulações lipossomais contendo uma ou mais dinitroanilinas, incorporadas ou encapsuladas, a processos para a preparação destas formulações e à utilização das formulações lipossomais, para o tratamento de infecções em humanos ou animais.


As formulações lipossomais podem conter como dinitroanilina, por exemplo, de preferência a trifluralina (TFL).

Para além da ou das dinitroanilinas, as formulações lipossomais da invenção contêm também fosfolípidos individualmente ou em misturas, hidrogenados ou não, com e sem colesterol (CHOL) e moléculas electricamente carregadas, lipídicas ou não, como, por exemplo, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), estearilamina (SA).

Antecedentes da invenção

As doenças causadas por parasitas intracelulares das células do sistema fagocitário mononuclear (do inglês: mononuclear phagocytic system - MPS) estão entre as doenças mais importantes em todo mundo, devido ao elevado número de casos registados anualmente. Uma destas doenças é a leishmaniose, causada por um tipo de organismo protozoário hemoflagelado denominado, no geral, por *Leishmania sp.* Esta doença tem uma incidência de, pelo menos, 12 milhões de casos entre humanos e animais. O cão desempenha um papel fundamental como reservatório do protozoário, sendo o principal responsável pela manutenção desta zoonose. A doença é propagada do reservatório para os humanos por vectores (melgas, mosquitos – sandflies). A leishmaniose representa um problema de saúde de grande dimensão no Médio Oriente, África, China, América Central, América do Sul e outras áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo como a região Mediterrânea, incluindo Portugal (33, 34).

A leishmaniose, dependendo da subespécie de protozoário que a causa, apresenta várias formas da doença: visceral, mucocutânea e cutânea. A forma visceral da doença é normalmente fatal se não for tratada. Todas as formas podem ser recorrentes apesar de




tratadas com compostos de antimónio que são, nesta doença, os fármacos de primeira escolha (20, 26, 33, 34).

As *Leishmania sp* são capazes de viver dentro das células do sistema fagocitário mononuclear, residindo numa vesícula membranar da célula hospedeira (2, 5, 14, 16, 31). A fusão dos lisossomas da célula hospedeira com o vacúolo do parasita, não impede a multiplicação das leishmanias. Antes pelo contrário, esta fusão pode fornecer os nutrientes necessários à sua multiplicação. Assim, o parasita parece estar em segurança dentro da célula, sendo esta uma das razões porque a sua eliminação é tão difícil. Apesar disso, pode tirar-se partido deste mecanismo de fusão lisossomas - vacúolo para terapias alternativas nomeadamente através do mecanismo de internalização dos lipossomas pelas células do MPS (2).

Várias classes diferentes de fármacos têm sido usados para tratar a leishmaniose, nomeadamente antimónio pentavalente, antimónio trivalente, antibióticos (poliénicos, aminoglucósidos), imunomoduladores (interferão alfa) e agentes quelantes (desferrioxamina), entre outros (26, 30, 32, 35).

O tratamento actualmente recomendado na leishmaniose canina consta de fármacos antimoniais pentavalentes - estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina. No entanto, a eficácia deste tratamento é limitada, não se atingindo uma cura completa da doença. Além da falta de sucesso, estas terapias têm vários problemas, particularmente: eficácia variável, necessidade de tratamentos longos e efeitos secundários graves tais como toxicidade cardíaca e renal. Tem ainda sido referido o aumento de resistências aos fármacos antimoniais pentavalentes, atribuído a tratamentos inadequados (9, 20, 24, 26, 32, 33, 35).

Outros fármacos usados no tratamento da leishmaniose também têm efeitos secundários graves que limitam a sua aplicação clínica, como a anfotericina B que é nefrotóxica (14, 20) e o metotrexato (MTX) que evidencia toxicidade cardíaca (10, 11). Embora tenham sido conseguidos alguns progressos no desenvolvimento de novos fármacos, nenhum deles é 100% eficaz no tratamento da doença. Além dos efeitos tóxicos já referidos, a outra principal desvantagem dos fármacos usados contra as infecções por *Leishmania sp* é a pequena eficácia dos tratamentos (14). Como exemplos desses fármacos podemos referir o metotrexato (que reduz só 85% da infecção) (10, 11) a pentamidina (menos eficaz que os derivados de antimónio); a desidroemetina, com o qual se atinge 67% de cura (1) e a desferrioxamina, com uma eficácia de só 44% (32).



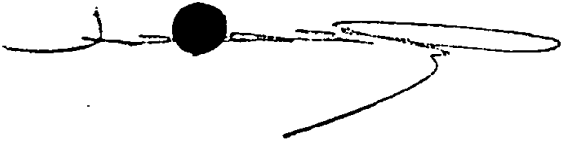
Em casos em que os tratamentos com fármacos antimoniais pentavalentes falham, observou-se que tratamentos subsequentes com outros tipos de fármacos, tais como a pentamidina, anfotericina B, cetoconazole e paramomicina, não melhoram significativamente os resultados. Também a formicina B, a sinefungina e a lepidina WR6026 mostraram alta actividade leishmanicida quando comparadas com o antimónio pentavalente, embora os problemas de toxicidade persistam (26, 27).

O alopurinol e compostos relacionados (nucleósido de alopurinol, tiopurinol, ribonucleósido de tiopurinol) foram também testados in vitro e in vivo (27). Os protozoários não são capazes de sintetizar purinas, dependendo das purinas e dos nucleósidos do hospedeiro. A presença de análogos da inosina (ex. ribonucleósido de alopurinol) inibem os enzimas metabolizadores da purina, nestes parasitas, afectando a função do RNA e reduzindo a síntese proteica (26, 27). Em estudos anteriores verificou-se que o alopurinol, o ribonucleósido de alopurinol e o ribonucleósido de tiopurinol têm uma pequena actividade em modelos animais de infecção, provavelmente devido ao pequeno tempo de residência e pequenos níveis séricos atingidos por estes fármacos (27).

Antibióticos tais como a estreptomicina e a trobamicina inibem o crescimento das formas promastigotas e amastigotas do parasita (25).

A trifluralina é um herbicida cuja actividade leishmanicida tem sido testada. Este fármaco liga-se às tubulinas das plantas mas não às dos animais. As tubulinas da *Leishmania sp* são muito semelhantes às tubulinas das plantas. Assim, a trifluralina demonstrou inibir a proliferação das formas promastigotas, diminuir a transformação de promastigotos para amastigotos, interferir com a replicação de amastigotos e diminuir a infectividade destes. Estudos in vitro mostraram efeitos contra todas as formas de leishmaniose, mas os estudos in vivo só apresentam resultados positivos para as formas cutâneas da doença. Para as formas viscerais terá de ser desenvolvido um sistema de transporte do fármaco uma vez que a sua solubilidade e lipofilicidade não permitem a administração da droga por outra via que não seja tópica. Por esta via não se verifica qualquer actividade contra as formas viscerais (12).

Perante as dificuldades acima descritas, uma estratégia alternativa à procura de novos fármacos é a incorporação dos já existentes em transportadores direccionados para macrófagos, o que acontece naturalmente com lipossomas.



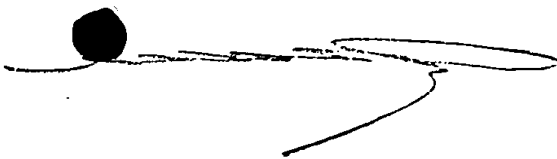
Lipossomas são microsferas de fosfolípidos organizados em bicamadas capazes de imobilizar inúmeras substâncias independentemente do seu peso molecular, carga eléctrica e solubilidade (18, 19, 23).

A justificação para a utilização de fármacos associados a lipossomas, e não de fármacos na forma livre, para o tratamento de leishmaniose visceral, baseia-se em que a forma amastigótica do parasita está especificamente localizada nos macrófagos do fígado, baço e medula óssea. Como os lipossomas são preferencialmente capturados por estas células (2, 5, 30), podem conduzir os fármacos directamente ao local intracelular em que os parasitas se alojam (28). Portanto, a administração de agentes biológicos em lipossomas pode aumentar, teoricamente, o índice terapêutico do agente de dois modos: primeiro, aumentando a captura do transportador e consequentemente do fármaco pelos macrófagos que contêm os parasitas; segundo, reduzindo a toxicidade inerente ao fármaco livre, dada a baixa captura dos lipossomas por aqueles órgão (2, 6, 16, 20).

A grande maioria dos sistemas transportadores de fármacos administrados por via intravenosa, são retirados da circulação pelo fígado, ou seja, acumulam-se preferencialmente neste órgão em detrimento de outros, também pertencentes ao MPS (baço e medula óssea). Pode, no entanto, aumentar-se a captura por estes órgãos através da redução do tamanho das vesículas (8). Tal pode resultar na supressão da infecção no baço e medula óssea o que dificilmente se conseguiria com fármacos na forma livre.

Os resultados publicados na literatura confirmam que fármacos encapsulados em lipossomas são muito mais seguros e mais eficazes no tratamento de infecções do MPS, em comparação com os fármacos na forma livre (5, 17, 28). Os fármacos antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas podem aumentar o índice terapêutico desde 200 a 700 vezes comparativamente com o fármaco livre, dependendo da composição lipídica dos lipossomas (4, 7, 8, 13). A anfotericina B lipossomal é 2 a 5 vezes mais activa que o fármaco livre (6, 29). A primaquina lipossomal apresenta actividade em doses em que a forma livre não é activa (3). Contudo, estes resultados são fortemente dependentes do estado da infecção no início do tratamento e são difíceis de correlacionar devido à heterogeneidade das condições experimentais.

A maioria dos resultados acima referidos estão limitados pelo tipo de lipossomas usados, com baixa eficácia de encapsulação e pequenos tempos de meia vida, não atingindo os alvos cruciais para o tratamento desta doença e ainda pelo seu elevado custo. A anfotericina B lipossomal utilizada em humanos (testes clínicos) tem curado alguns



casos de leishmaniose visceral (16, 21, 22), mas o seu custo é tão elevado que o seu uso em animais é proibitivo.

Descrição Pormenorizada da Invenção

A presente invenção refere-se a formulações lipossomais contendo uma ou várias dinitroanilinas e a processos para a sua preparação.

A presente invenção baseia-se na obtenção, sob a forma estável, liofilizada ou não, de formulações lipossomais que contêm uma ou várias dinitroanilinas, por exemplo a trifluralina incorporada ou encapsulada.


Nas formulações da presente invenção de preferência o diâmetro dos lipossomas varia entre 0,01 μm e 50 μm . De acordo com uma forma preferida de concretização, existem nas formulações da presente invenção populações de partículas de diferente tamanho misturadas, de modo especialmente preferido com diâmetros respectivamente superior e inferior a 100 nm.

Adicionalmente as formulações da presente invenção podem conter qualquer dos seguintes lípidos, hidrogenados ou não, individualmente ou em misturas, em qualquer razão molar: diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina (PC), colesterol (Chol) ou derivados, esfingomiélin (SM), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), fosfatidilglicerol (PG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), gangliósidos, ceramidas, fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), dicetilfosfato (DcP), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), estearilamina (SA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) ou outros lípidos sintéticos.

O processo de preparação das formulações da presente invenção compreende os passos de:

- hidratação a partir de um filme lipídico contendo a dinitroanilina para obtenção de uma formulação lipossomal;
- liofilização;
- reidratação.

De um modo típico, pode efectuar-se a solubilização em solvente orgânico dos componentes lipídicos e da dinitroanilina ou das dinitroanilinas, por exemplo a trifluralina,



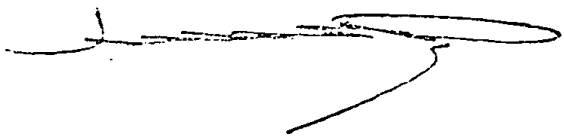
seguida de secagem em fluxo de azoto ou sob vácuo, por exemplo num evaporador rotativo com temperatura controlada, e obtenção de um filme conjunto é homogêneo de lípido e da dinitroanilina ou das dinitroanilinas, por exemplo da trifluralina. Este filme pode ser, de seguida, hidratado com uma solução de uma ose, formando lipossomas multilamelares. O passo seguinte pode ser o dimensionamento da formulação lipossomal, sob pressão, através de extrusões sucessivas por membranas de policarbonato de poro variando de 5,0 a 0,01 μm . O dimensionamento terminará de preferência na passagem pela membrana de porosidade desejada para uma parte da população. Após obtenção das diferentes populações necessárias de diâmetro bem determinado, o passo seguinte é a mistura dessas populações. Após a mistura das populações poderá ou não realizar-se uma diálise concentrativa, utilizando, por exemplo, polietilenoglicol como agente higroscópico, seguindo-se a desidratação das mesmas. Esta desidratação ocorre assim de preferência na presença das oses que vão funcionar como protectoras da sublimação da dinitroanilina ou das dinitroanilinas, por exemplo da trifluralina.

As formulações da presente invenção, assim obtidas, após hidratação com água, estão prontas, a ser utilizadas.

Até à presente data não existe qualquer referência na literatura a preparações lipossomais de dinitroanilinas.

De acordo com a presente invenção, para preparar os lipossomas multilamelares é feita a secagem de uma mistura de uma dinitroanilina, nomeadamente a trifluralina, e lípidos, ambos solubilizados no mesmo solvente ou mistura de solventes orgânicos. A quantidade de trifluralina varia consoante o volume final a preparar, podendo ir de 10 μg a 1 g ou mais. A quantidade de lípido varia também consoante o volume final a preparar, podendo ir de 1 μmol a 1 mol ou mais. Os lípidos adequados, hidrogenados ou não, para utilização nas formulações estão presentes individualmente ou em misturas, em proporções variadas, de entre os seguintes lípidos: diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina (PC), colesterol (Chol) ou derivados, esfingomiéline (SM), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), fosfatidilglicerol (PG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), gangliósidos, ceramidas, fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), dicetilfosfato (DcP), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), estearilamina (SA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e outros lípidos sintéticos.


A mistura assim obtida é submetida a secagem sob fluxo de azoto, até à remoção completa do solvente ou mistura de solventes. Após secagem, realiza-se a hidratação da



mistura com uma solução de uma ose, como por exemplo a trealose, cuja concentração pode variar de 0,01 M a 2 M, sob agitação mecânica ou manual externa. A formulação lipossomal assim obtida é, de seguida, submetida a um dimensionamento, por exemplo, realizando passagens sucessivas da formulação por filtros de polycarbonato com diâmetro de poros sucessivamente decrescentes, sob pressão, processo normalmente denominado por extrusão. A extrusão inicia-se normalmente por membranas de diâmetro de poro de 5 μm e continua por passagens por membranas de diâmetro de poro de 2, 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05 μm , podendo chegar a 0,02 μm . Segundo uma forma de concretização preferida da invenção e após a passagem por membranas de 0,4 μm , procede-se à separação da formulação lipossomal em duas partes. Apenas uma das partes continua o processo de extrusão até, por exemplo, a membranas de diâmetro de poro igual a 0,05 μm . No final, as duas partes, que correspondem a duas populações distintas, são misturadas, obtendo-se, por esta forma, uma formulação lipossomal contendo lipossomas que apresentam duas distribuições de populações de diferentes diâmetros. A presença simultânea destas populações de diâmetros diferentes apresenta a vantagem de, após administração parenteral in vivo, a população de maior diâmetro ser rapidamente capturada pelas células do sistema fagocitário mononuclear, enquanto a população de pequeno tamanho permanece em circulação, podendo atingir outros órgãos que não o fígado e o baço, onde a infecção parasitária também exista como, por exemplo, a medula óssea.

A formulação assim obtida pode, ou não, ser submetida a uma concentração por diálise contra, por exemplo, polietilenglicol, cuja função é retirar água ao sistema. Após este passo de diálise, a formulação pode ser congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante, pelo menos uma hora, sendo de seguida submetida a liofilização. Após esta liofilização a formulação está pronta a ser usada, bastando, para tal, adicionar água ao pó obtido da liofilização. A hidratação ocorre instantaneamente dando origem a uma suspensão homogênea de lipossomas contendo a ou as dinitroanilinas, por exemplo a TFL, em água.

Uma forma de concretização particularmente preferida da invenção é aquela em que a uma mistura lipídica de DOPC:DOPG na razão molar 7 : 3, no total de 10 μmol de lípido, solubilizado em clorofórmio, é adicionado 1 μmol de trifluralina, solubilizada em clorofórmio. A mistura assim obtida é, de seguida, submetida a secagem sob fluxo de azoto até evaporação total do clorofórmio. O filme obtido é hidratado com 0,1 mL de trealose 0,3 M, com agitação manual. Após ressuspensão completa do filme lipídico, a formulação repousa durante 15 minutos, após os quais são adicionados mais 0,1 mL da mesma solução de trealose. Segue-se um novo período de repouso de 15 minutos e completa-se a hidratação com mais 0,8 mL da mesma solução. A formulação lipossomal



assim obtida, é submetida a dimensionamento por passagem, sob pressão, por filtros de polycarbonato de poros sucessivamente decrescentes, de 5 μm a 0.4 μm . Após esta extrusão, a formulação é dividida em duas partes iguais. Uma dessas partes continua o processo de dimensionamento até filtro de 0,05 μm . As duas populações lipossomais assim obtidas são, de seguida, adicionadas uma à outra. A formulação lipossomal mista é submetida a congelamento a -70°C durante 60 minutos e, seguidamente liofilizada. Desta forma obtém-se uma formulação lipossomal pronta a ser hidratada com 1,0 mL de água destilada estéril e pronta a ser administrada parentericamente.

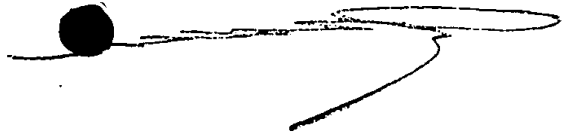
As formulações podem conter substâncias auxiliares, farmacêuticamente aceitáveis, úteis para a preservação da sua qualidade e ou para as aproximarem das condições fisiológicas, tais como agentes de ajuste do pH e agentes tamponantes, agentes do ajuste de tonicidade, antioxidantes e outros adjuvantes, por exemplo: acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, glucose, sacarose, manitol, xilitol, alfa-tocoferol.

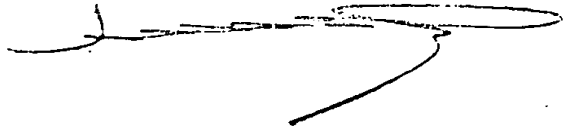
As formulações farmacêuticas da invenção podem ser administradas a animais de sangue quente, como o homem, já sofrendo de leishmaniose, durante o intervalo de tempo suficiente e numa quantidade suficiente para terminar ou inibir significativamente a progressão da infecção. As quantidades adequadas para a obtenção desse efeito são definidas como "doses terapeuticamente eficazes". As quantidades eficazes para esta utilização dependerão da gravidade da infecção e do estado geral de saúde do indivíduo em tratamento. Não existe qualquer formulação do fármaco livre, nomeadamente trifluralina, utilizada em administrações parentéricas.

Os seguintes exemplos, de formulações lipossomais preparadas pelo presente processo e das respectivas análises físico-químicas e biológicas, são apresentados como ilustração e não como limitação.

Literatura

1. Al-Kateeb, G.H., Molan, A.L. (1981) "Efficacy of some drugs on *Leishmania donovani* in the Golden Hamster, *mesocricetus auratus*" Chemother. 27, 117-125.
2. Alving, C.R. (1983) "Delivery of liposome-encapsulated drugs to macrophages" Pharmac. Ther. 22, 407-424.

- 
3. Alving, C.R., Steck, E.A., Chapman Jr, W.L., Waits, V.B., Hendricks, L.D., Swartz Jr, G.M., Hanson, W.L. (1980) "Liposomes in leishmaniasis: therapeutic effects of antimonial drugs, 8-aminoquinolines and tetracycline" *Life Sciences* 26, 2231-2238.
 4. Alving, C.R., Steck, E.A., Chapman Jr., W.L., Waits, V.B., Hendricks, L.D., Swartz Jr., G.M., Hanson, W.L. (1978) "Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2959-2963.
 5. Alving, C.R., Steck, E.A., Hanson, W.L., Loizeaux, P.S., Chapman Jr, W.L., Waits, V.B. (1978) "Improved therapy of experimental leishmaniasis by use of a liposome-encapsulated antimonial drug" *Life Sciences* 22, 1021-1026.
 6. Berman, J.D., Hanson, W.L., Chapman, W.L., Alving, C.R., Lopez-Berestein, G. (1986) "Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys" *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 847-851.
 7. Black, C.D.V., Watson, G.J. (1977) "The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis" *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 550-552.
 8. Carter, K.C., Dolan, T.F., Alexander, J., Baillie, A.J., McColgan, C. (1989) "Visceral leishmaniasis: drug carrier system characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice" *J. Pharm. Pharmacol.* 41, 87-91.
 9. Carter, K.C., O'Grady, J., Dolan, T.F., Baillie, A.J., Alexander, J., Keys, J. (1989) "A direct comparison of sodium stibogluconate treatment in two animal models of human visceral leishmaniasis, mouse and hamster" *Int. J. Pharm.* 53, 129-137.
 10. Chakraborty, P., Bhaduri, A.N., Das, P.K. (1990) "Neoglycoproteins as carriers for receptor-mediated drug targeting in the treatment of experimental visceral leishmaniasis" *J. Protozool.* 37, 358-364.
 11. Chakraborty, P., Bhaduri, A.N., Das, P.K. (1990) "Sugar receptor mediated drug delivery to macrophages in the therapy of experimental visceral leishmaniasis" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 166, 404-410.
 12. Chan, M.M.-Y., Grogl, M., Chen, C.-C., Bienen, E.J., Fong, D. (1993) "Herbicides to curb human parasitic infections: *In vitro* and *in vivo* effects of trifluralin on the trypanosomatid protozoans" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5657-5661.
 13. Chapman Jr., W.L., Hanson, W.L., Alving, C.R., Hendricks, L.D. (1984) "Antileishmanial activity of liposome-encapsulated meglumine antimoniate in the dog" *Am. J. Vet. Res.* 45, 1028-1030.

- 
14. Croft, S., (1989) "Recent advances in anti-protozoal chemotherapy" Actual. Chim. Ther. 20, 57-70.
 15. Croft, S., Neal, R.A., Rao, L. (1989) "Liposomes and other drug delivery systems in the treatment of leishmaniasis" pp. 783-792; in "Leishmaniasis: the currents status and new strategies for control", ed. by Harte, D.T., New York: Plenum Press.
 16. Croft, S.L., Davidson, R.N., Thornton, E.A. (1991) "Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis" J. Antimicrob. Chemother. 28, 111-118.
 17. Croft, S.L., Hogg, J., Gutteridge, W.E., Hudson, A.T., Randall, A.W. (1992) "The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*" J. Antimicrob. Chemother. 30, 827-832.
 18. Cruz, M.E., Corvo, M.L., Jorge, J.S., Lopes, F. (1989) "Liposomes as carrier systems for proteins: factors affecting protein encapsulation" pp. 417-426, in "Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer", ed by Lopez-Berestein G. and Fidler I.J., New York: Alan R. Liss, Inc.
 19. Cruz, M.E.M., Gaspar, M.M., Lopes, F., Jorge, J.S., Perez-Soler, R. (1993) "Liposomal L-asparaginase: in vitro evaluation" Int. J. Pharm. 16, 67-77.
 20. Davidson, R.N., Croft, S.L. (1993) "Recent advances in the treatment of visceral leishmaniasis" Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87, 130-31, 141.
 21. Dupla, M.L., Aguado, A.G., Uriol, P.L., Garcia, V.P., Ortega, E.V., Martinez, P.M., Garcipuig, J. (1993) "Efficacy of liposomal amphotericin-B in the treatment and secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV infected patients - report of two cases" J. Antimicrob. Chemother. 32, 657-659.
 22. Giacchino, R., Giambartolomei, G., Tasso, L., Timitilli, A., Castagnola, E., Brisigotti, M., Micalizzi, C. (1993) "Treatment with liposomal amphotericin B of a child affected with drug-resistant visceral leishmaniasis" Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87, 310.
 23. Gregoriadis, G. (1991) "Overview of liposomes." J. Antimicrobial Chemotherapy 28S, 39-48.
 24. Madindou, T.J., Hanson, W.L., Chapman Jr, W.L. (1985) "Chemotherapy of visceral leishmaniasis (*Leishmania donovani*) in the squirrel monkey (*Samiri sciureus*)" Annals Trop. Med. Parasitol. 79, 13-19.
 25. Navin, T.R., Pearson, R.D., (1987) "Inhibition of *Leishmania donovani* growth by streptomycin and tobramycin" Ann. Trop. Med. Parasitol. 81, 6, 731-733.
 26. Neal, R.A. (1987) "Experimental chemotherapy" pp. 793-845, in The Leishmaniasis. Vol



II, London: Academic Press, Inc.

27. Neal, R.A., Croft, S.L., Nelson, D.J. (1985) "Anti-leishmanial effect of allopurinol ribonucleoside and the related compounds, alluporinol, thiopurinol, thiopurinol ribonucleoside, and of formycin B, sinefungin and the lepidine WR6062" Trans. Royal Society Trop. Med. Hyg. 79, 122-128.
28. New, R.R.C., Chance, M.L., Thomas, S.C., Peters, W. (1978) "Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes" Nature 272, 55-56.
29. Ramos, H., Romero, E., Cohen, B.E. (1988) "The differential effect of liposomal amphotericin B on human erythrocytes and promastigotes of *Leishmania sp.*" Acta Cient. Venezolana 39, 135-139.
30. Reed, S.G., Barral-Netto, M., Inverso, J.A. (1984) "Treatment of experimental visceral leishmaniasis with lymphokine encapsulated in liposomes" J. Immunol. 132, 3116-3119.
31. Rees, P.H., Kager, P.A. (1987) "Visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis" in: The Leishmaniasis in Biology and Medicine, ed. by: W. Peters and R. Killick-Kendrick, Vol. 2, 584-615, Academic Press, London.
32. Segovia, M., Navarro, A., Artero, J.M. (1989) "The effect of liposome-entrapped desferrioxamine on *Leishmania donovani* in vitro" Ann. Trop. Med. Parasitol. 83, 357-360.
33. WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases (1984) "The Leishmaniases: Report of a WHO Expert Committee" vol. 701, in WHO Technical Report Series, ed. by World Health Organization, Geneva.
34. WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases (1990) "Control of leishmaniases: Report of a WHO Expert Committee" vol. 793, in WHO Technical Report Series, ed. by World Health Organization, Geneva.
35. Zumla, A., Croft, S.L. (1992) "Chemotherapy and immunity in opportunistic parasitic infections in AIDS" Parasitology 105, S93-S101.

Exemplos

Estes exemplos ilustram formulações lipossomais preparadas de acordo com a presente invenção e processos para a sua preparação em que a dinitroanilina utilizada foi a trifluralina.



Incorporação d trifluralina (TFL) em lipossomas

A preparação das formulações a seguir evidenciadas, no volume inicial de 5 ml por composição lipídica, iniciou-se pela adição da TFL ao lípido em clorofórmio, seguindo a evaporação do solvente por arrastamento em fluxo de azoto. A hidratação do filme resultante fez-se pela adição de 500 µl de trealose 0,3 M, agitação e repouso durante 15 minutos, adição de mais 500 µl de trealose 0,3 M, nova agitação e novo período de 15 minutos de repouso e, finalmente pela adição de 4000 µl de trealose 0,3 M. Foram retiradas amostras para doseamento (TFL inicial e LIP inicial). As formulações lipossomais assim obtidas foram dimensionadas por filtrações sucessivas, sob pressão de azoto, por filtros de polycarbonato de poro 5,0, 2,0, 1,0, 0,8, 0,6 e 0,4 µm, com duas passagens no caso deste último (extrusão). A TFL não incorporada, por ser insolúvel em soluções aquosas, cristaliza sob a forma de palhetas e fica retida nestes filtros. Após a extrusão pelo filtro de 0,4 µm, as formulações são divididas em duas partes iguais. Com uma dessas partes continua-se o processo de extrusão, agora por membranas com poros de diâmetros 0,2 e 0,1 µm, com duas passagens no caso deste último. À parte das formulações lipossomais que realizaram o processo de extrusão até membranas de poro 0,4 µm, dá-se o nome de VET400 (do inglês: vesicles extruded through 400 nm). À parte das formulações lipossomais que realizaram o processo de extrusão até membranas de porosidade 0,1 µm, dá-se o nome de VET 100. As formulações VET 400 e VET 100 obtidas pelo processo anterior são finalmente doseadas (TFL final e LIP final).

A **Tabela 1a** apresenta o efeito da composição lipídica nos parâmetros de incorporação da TFL em lipossomas dimensionados até filtros de porosidade 0,4 µm. A **Tabela 1b** apresenta o efeito da composição lipídica nos parâmetros de incorporação da TFL em lipossomas dimensionados até filtros de porosidade 0,1 µm. As formulações foram preparadas com composições lipídicas diferentes, com quantidades iniciais de lípido e TFL apresentadas nas referidas tabelas. A eficácia de incorporação (E.I.) corresponde ao quociente entre as razões (fármaco/lípido) final e inicial e exprime-se em percentagem. O rendimento exprime-se igualmente em percentagem e pode ser referido quer ao rendimento do processo relativamente ao fármaco (TFLf/TFLi) quer ao lípido (LIPf/LIPi).

TABELA 1a - Efeito da composição lipídica nos parâmetros de incorporação da TFL em lipossomas dimensionados até 0,4 µm

Formulação	Composição Lipídica		TRL	TRL	LIP	LIP	(TRL/LIP) _i	(TRL/LIP) _f	LIP/LIP	TRL/TRL	EI
nr	Razão Molar		(µg)	(µg)	(µmol)	(µmol)	(g/mol)	(g/mol)	(%)	(%)	(%)
1	PCO-CL	média	332,03	140,78	11,52	9,48	29,09	14,37	81,72	44,89	52,97
		desvio padrão	43,50	75,14	0,82	2,24	5,80	5,65	13,62	28,53	27,54
		mediana	330,73	144,47	11,41	8,25	28,99	17,52	75,55	43,68	60,43
2	DMPCO-CL	média	367,60	110,90	12,58	10,20	30,02	11,30	80,37	30,31	37,95
		desvio padrão	50,82	14,34	3,02	3,00	5,71	2,16	6,08	3,55	6,17
		mediana	346,53	119,18	13,87	10,75	28,85	11,08	77,52	28,53	37,42
3	DSPCO-CL	média	380,66	170,81	13,48	10,75	29,13	15,88	79,86	44,09	55,24
		desvio padrão	64,63	29,75	1,33	1,03	5,04	2,37	4,10	8,05	9,76
		mediana	368,40	185,55	13,76	10,35	29,79	15,55	81,42	40,92	54,40
4	DPPCO-CL	média	322,83	84,72	9,14	7,38	35,37	11,17	80,88	24,75	31,59
		desvio padrão	31,36	82,60	0,98	0,87	2,14	10,17	6,80	23,66	29,64
		mediana	334,68	89,15	8,85	7,31	34,43	13,61	80,99	26,64	35,99
5	HPCO-CL	média	328,77	128,65	10,34	8,13	36,97	16,55	81,90	39,41	49,77
		desvio padrão	24,77	11,07	3,92	2,32	20,48	3,77	14,78	5,79	14,16
		mediana	330,73	133,40	12,46	8,45	26,54	16,17	80,69	41,29	54,55
6	PCO-CL	média	309,65	190,30	10,40	8,49	29,78	22,42	81,61	61,42	75,26
		desvio padrão	8,22	11,06	0,23	0,10	1,37	1,12	2,40	2,06	0,62
		mediana	307,02	190,30	10,30	8,45	29,81	22,63	81,65	61,98	75,19
7	HPCO-CL	média	334,68	114,95	11,87	8,49	29,71	13,29	71,63	35,35	50,85
		desvio padrão	47,42	52,36	2,77	2,46	10,81	3,61	11,53	16,98	25,27
		mediana	334,68	109,70	11,95	7,16	24,03	14,99	77,52	38,19	65,43
8	PCPG	média	318,87	323,03	11,85	11,90	26,90	27,15	100,40	101,34	100,93
		desvio padrão	3,95	8,51	0,16	0,12	0,19	0,99	0,43	3,85	3,59
		mediana	318,90	326,70	11,76	11,86	26,81	27,55	100,34	102,45	101,58
9	DMPCO-CL	média	388,04	117,60	12,19	9,56	31,98	12,37	78,46	30,27	38,63
		desvio padrão	69,86	22,30	2,40	1,87	2,42	1,24	4,06	0,70	1,59
		mediana	370,24	114,44	12,60	10,46	32,37	13,06	77,03	30,38	38,32
10	DSPCO-CL	média	325,36	135,52	11,76	9,19	28,87	15,22	79,99	42,08	52,47
		desvio padrão	41,59	12,68	3,52	1,78	6,17	3,72	9,53	6,33	1,76
		mediana	336,29	136,60	11,99	9,29	30,05	15,89	77,48	40,96	52,87

Os valores apresentados representam a média, desvio padrão e mediana de, pelo menos, três preparações

Abreviações:

TRL Trifluralina inicial
TRL Trifluralina final

LIP Lipídio inicial
LIP Lipídio final

(TRL/LIP)_i Razão inicial TRL/LIP
(TRL/LIP)_f Razão final TRL/LIP

LIP/LIP
TRL/TRL

Rendimento de LIP
Rendimento de TRL
EI Eficácia de incorporação

TABELA 1a - Efeito da composição lipídica nos parâmetros de incorporação da TFL em lipossomas dimensionados até 0,4 µm

(cont.)

Formulação	Composição Lipídica		TRLi	TRLf	LPI	LPIf	(TRLi/LPIi)	(TRLi/LPIf)	LPIf/LPIi	TRLf/TRLi	EI
nº	Razão Molar		(µg)	(µg)	(µmol)	(µmol)	(g/mol)	(g/mol)	(%)	(%)	(%)
11	DFFCO-CHL 4:1	média	318,22	82,83	9,11	7,82	34,72	10,26	86,15	24,39	28,97
		desvio padrão	64,51	55,90	1,22	0,79	2,47	6,43	5,17	14,06	17,36
		mediana	310,97	97,05	9,18	7,52	33,86	12,90	84,64	31,21	38,10
12	PCO-CHL (Soja) 4:1	média	397,89	165,01	10,45	7,68	39,69	21,68	73,84	41,25	56,09
		desvio padrão	22,78	32,43	2,63	1,83	9,65	1,37	5,23	5,84	9,00
		mediana	395,90	165,59	11,93	8,09	35,10	21,23	76,62	42,08	60,49
13	DFFCO-DFFG 7:3	média	301,09	101,27	9,49	6,12	31,76	16,70	64,29	33,63	52,49
		desvio padrão	13,69	7,80	0,50	0,98	1,80	1,69	7,18	2,16	2,47
		mediana	293,19	104,95	9,67	6,12	32,76	17,41	63,26	33,62	53,14
14	DOPCO-DOPG 7:3	média	323,50	178,09	10,35	8,17	31,31	22,04	78,27	56,36	71,36
		desvio padrão	37,57	33,67	0,80	2,05	3,40	2,14	13,64	10,93	14,41
		mediana	324,80	185,55	10,37	7,67	32,35	22,02	73,99	57,55	64,66
15	PCO-CHL-FG 10:5:1	média	313,63	148,11	12,33	10,44	25,69	13,86	85,09	46,77	55,25
		desvio padrão	44,63	58,94	2,19	1,50	3,48	3,71	5,56	14,64	18,66
		mediana	309,00	139,70	11,82	10,75	24,48	13,00	84,43	51,45	56,58
16	PCO-CHL-FI 10:5:1	média	337,98	143,42	12,23	9,45	27,98	15,17	76,72	41,89	54,68
		desvio padrão	40,38	42,01	2,55	2,67	2,73	0,72	8,44	7,00	7,22
		mediana	320,85	120,76	11,13	8,40	27,76	15,38	80,69	38,06	56,78
17	PCO-CHL-SA 10:5:1	média	290,55	95,06	10,54	8,32	27,79	10,72	77,60	31,24	38,37
		desvio padrão	35,45	81,33	1,89	2,85	2,09	6,87	12,71	23,70	25,01
		mediana	277,39	81,25	10,38	7,39	26,72	13,42	71,16	30,83	44,43
18	DFFCO-CHL-DFFG 10:5:1	média	324,80	23,82	9,03	6,93	35,87	3,36	76,96	7,53	9,42
		desvio padrão	47,95	10,52	0,26	1,26	4,34	1,24	16,02	3,71	3,38
		mediana	338,63	29,09	9,15	6,82	37,01	3,53	73,96	8,42	11,37
19	PCO-CHL-DSPE-PEG 37:1:0:3	média	231,29	213,26	9,47	9,01	24,41	23,69	95,12	92,39	97,10
		desvio padrão	13,16	3,65	0,06	0,28	1,26	0,97	3,51	5,15	2,95
		mediana	227,99	215,37	9,46	9,12	24,20	23,36	95,82	91,69	96,20
20	DSPC-CHL-DSPE-PEG 8:2:0:5	média	322,82	192,21	10,20	8,26	32,73	22,96	80,10	64,79	76,58
		desvio padrão	60,28	85,16	1,68	2,61	10,23	5,35	14,25	42,28	36,40
		mediana	350,48	171,01	10,45	7,11	34,85	25,42	76,43	48,79	63,84

Os valores apresentados representam a média, desvio padrão e mediana de, pelo menos, três preparações

Abreviações:

TRLi Triturina inicial

TRLf Triturina final

LPI Lipido inicial

LPIf Lipido final

(TRLi/LPIi) Razão inicial TRLi/LPI

(TRLf/LPIf) Razão final TRLi/LPI

LPIf/LPIi

TRLf/TRLi

Rendimento de LPI

Rendimento de TRL

EI, Eficácia de incorporação

TABELA 1b - Efeito da composição lipídica nos parâmetros de incorporação da TFL em lipossomas dimensionados até 0,1 µm

Formulação	Composição Lipídica		TFLi	TFLf	LIPi	LIPf	(TFL/LIP) _i	(TFL/LIP) _f	LIP/LIPi	TFLf/TFLi	E.I.
nº	Razão Molar		(µg)	(µg)	(µmol)	(µmol)	(g/mol)	(g/mol)	(%)	(%)	(%)
1	PC:CHOL	média	332,03	70,67	11,52	7,15	29,09	9,47	61,60	22,54	34,74
		desvio padrão	43,50	42,29	0,82	2,39	5,80	2,71	17,24	16,29	16,65
		mediana	330,73	46,79	11,41	6,68	28,99	9,29	62,05	14,15	32,05
2	DMPC:CHOL	média	357,60	48,20	12,58	8,02	30,02	6,56	64,07	13,32	20,74
		desvio padrão	50,82	18,51	3,02	1,73	5,71	3,96	3,22	5,94	8,80
		mediana	346,53	49,95	13,87	8,90	28,85	5,61	65,81	11,74	19,45
3	DSPC:CHOL	média	390,66	94,90	13,48	8,18	29,13	12,09	61,43	24,80	43,97
		desvio padrão	64,63	10,82	1,33	1,60	5,04	3,87	15,02	5,48	22,33
		mediana	358,40	92,10	13,76	8,45	29,79	10,15	69,97	23,93	34,07
4	DPPC:CHOL	média	322,83	65,26	9,14	6,46	35,37	8,36	69,94	18,93	24,09
		desvio padrão	31,36	88,39	0,98	1,77	2,14	10,04	11,69	25,45	29,91
		mediana	334,68	29,93	8,85	5,49	34,43	5,55	65,79	8,94	14,69
5	HPC:CHOL	média	328,77	100,88	10,34	8,06	36,97	13,55	79,50	30,89	39,15
		desvio padrão	24,77	6,17	3,92	2,64	20,48	4,81	6,53	4,26	7,08
		mediana	330,73	98,42	12,46	9,19	26,54	10,85	78,13	29,76	40,34
6	PC:CHOL	média	309,65	114,22	10,40	6,18	29,78	18,48	59,42	36,69	62,12
		desvio padrão	8,22	3,80	0,23	0,07	1,37	0,40	1,43	1,11	2,89
		mediana	307,02	115,28	10,30	6,20	29,81	18,59	59,22	36,81	60,50
7	HPC:CHOL	média	334,68	73,83	11,87	7,42	29,71	9,72	62,43	22,60	36,47
		desvio padrão	47,42	30,47	2,77	2,00	10,81	1,63	6,04	9,88	15,63
		mediana	334,68	67,86	11,95	6,63	24,03	10,23	65,45	23,62	42,58
8	PC:PG	média	318,87	324,60	11,85	12,45	26,90	26,08	105,06	101,82	96,95
		desvio padrão	3,95	2,97	0,16	0,32	0,19	0,66	2,34	2,15	3,51
		mediana	318,90	325,90	11,76	12,63	26,81	25,80	105,07	102,20	95,16
9	DMPC:CHOL	média	388,04	52,41	12,19	7,22	31,98	6,95	57,76	13,11	21,95
		desvio padrão	69,86	26,11	2,40	2,74	2,42	1,29	14,36	5,49	4,90
		mediana	370,24	63,65	12,60	8,75	32,37	7,19	60,68	15,27	24,45
10	DSPC:CHOL	média	335,36	87,53	11,76	7,98	29,53	11,01	69,57	25,93	37,51
		desvio padrão	48,56	26,75	3,52	1,48	5,12	2,82	8,57	5,82	8,60
		mediana	360,40	79,45	11,99	8,32	30,06	10,34	69,39	23,53	35,51

Os valores apresentados representam a média, desvio padrão e mediana de, pelo menos, três preparações

Abreviaturas:

TFLi Trifluralina inicial
TFLf Trifluralina final

LIPi Lipido inicial
LIPf Lipido final

(TFL/LIP)_i Razão inicial TFL/LIP
(TFL/LIP)_f Razão final TFL/LIP

LIP/LIPi
TFLf/TFLi

Rendimento de LIP
Rendimento de TFL
E.I. Eficácia de incorporação

TABELA 1b - Efeito da composição lipídica nos parâmetros de incorporação da TRL em lipossomos dimensionados até 0,1 µm


(cont.)

Formulação	Composição Lipídica		TRL _i	TRL _f	LIP _i	LIP _f	(TRL/LIP) _i	(TRL/LIP) _f	LIP _f /LIP _i	TRL _f /TRL _i	E.I.
nº	Razão Molar		(µg)	(µg)	(µmol)	(µmol)	(g/mol)	(g/mol)	(%)	(%)	(%)
11	DPPC:CHOL 4:1	média	318,22	58,03	9,11	6,29	34,72	8,85	69,09	16,84	24,93
		desvio padrão	64,51	44,95	1,22	1,50	2,47	5,36	13,59	10,32	14,02
		mediana	310,97	48,90	9,18	6,07	33,86	9,97	76,57	15,72	29,44
12	PC:CHOL (Soja) 4:1	média	397,89	109,66	10,45	5,80	39,69	18,89	56,55	27,45	49,54
		desvio padrão	22,78	19,83	2,63	0,95	9,65	0,84	6,92	3,82	12,22
		mediana	395,90	119,49	11,93	6,02	35,10	18,53	55,12	29,09	52,78
13	DPPC:DPPG 7:3	média	305,04	33,09	8,71	3,83	35,03	8,83	44,42	10,90	25,40
		desvio padrão	25,83	12,77	0,32	1,65	2,54	0,80	20,32	4,48	4,00
		mediana	293,19	35,20	8,85	4,30	34,43	8,59	48,59	10,52	24,95
14	DOPC:DOPG 7:3	média	323,50	109,74	10,36	5,48	31,31	19,61	52,13	33,51	63,77
		desvio padrão	37,57	54,44	0,80	2,32	3,40	3,19	18,10	14,10	16,65
		mediana	324,80	100,53	10,37	4,55	32,35	20,71	43,88	35,24	64,03
15	PC:CHOL:PG 10:5:1	média	313,63	106,14	12,33	8,91	25,69	11,82	73,21	33,41	47,11
		desvio padrão	44,63	45,41	2,19	1,21	3,48	4,64	11,70	11,11	20,89
		mediana	309,00	97,36	11,82	9,06	24,48	9,70	73,14	35,66	42,22
16	PC:CHOL:PI 10:5:1	média	337,98	111,78	12,23	7,86	27,98	13,36	62,87	31,73	48,78
		desvio padrão	40,38	74,27	2,55	3,14	2,73	3,43	12,67	17,05	17,14
		mediana	320,85	71,02	11,13	6,54	27,76	11,95	62,82	22,13	43,05
17	PC:CHOL:SA 10:5:1	média	290,55	40,34	10,54	6,42	27,79	7,87	57,74	13,51	27,38
		desvio padrão	35,45	26,53	1,89	3,95	2,09	6,49	26,86	7,79	20,76
		mediana	277,39	40,47	10,38	5,99	26,72	6,31	57,67	15,35	23,87
18	DPPC:CHOL:DPPG 10:5:1	média	324,80	14,83	9,03	4,39	35,87	6,58	48,85	4,36	17,71
		desvio padrão	47,95	8,84	0,26	2,67	4,34	7,90	30,20	2,32	21,32
		mediana	338,63	19,39	9,15	5,69	37,01	3,41	61,73	5,32	8,62
19	PC:CHOL:DSPE:PEG 3,7:1:0,3	média	231,29	188,33	9,47	9,09	24,41	20,68	96,02	81,90	84,91
		desvio padrão	13,16	34,07	0,06	1,48	1,26	0,46	16,20	17,32	5,97
		mediana	227,99	182,71	9,46	8,75	24,20	20,88	92,49	83,01	86,75
20	DSPC:CHOL:DSPE:PEG 8:2:0,5	média	322,82	159,37	10,20	7,22	32,73	25,65	69,44	50,96	76,60
		desvio padrão	60,28	30,66	1,68	3,99	10,23	10,21	29,97	15,04	11,23
		mediana	350,48	163,74	10,45	5,73	34,85	30,25	68,21	53,53	78,47

Os valores apresentados representam a média, desvio padrão e mediana de, pelo menos, três preparações

Abreviaturas:

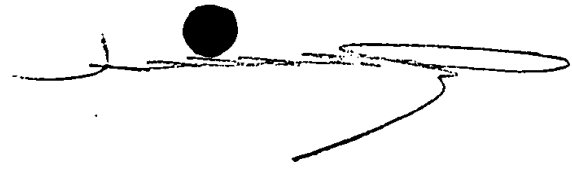
TRL_i Triturina inicial
TRL_f Triturina finalLIP_i Lipido inicial
LIP_f Lipido final(TRL/LIP)_i Razão inicial TRL/LIP
(TRL/LIP)_f Razão final TRL/LIPLIP_f/LIP_i
TRL_f/TRL_iRendimento de LIP
Rendimento de TRL
E.I. Eficácia de incorporação



Da análise das Tabelas 1a e 1b podem realçar-se algumas conclusões importantes, referentes ao efeito da presença de colesterol na composição lipídica, efeito da presença de moléculas carregadas na composição lipídica e efeito do uso de lípido com diferente temperatura de transição de fase. Assim, os resultados obtidos mostram que a TFL é melhor incorporada em lipossomas com baixo conteúdo de colesterol, como pode ser observado na Figura 1 (na formulação composta por PC:CHOL na razão molar 4:1). A diferença mais significativa foi observada para lipossomas com diâmetro mais pequeno (VET100). No que respeita à presença de moléculas carregadas na composição lipídica verifica-se que a TFL é fracamente incorporada em lipossomas carregados positivamente (PC:CHOL:SA) e que, apesar dos melhores resultados terem sido obtidos com lipossomas electricamente neutros (PC:CHOL), lipossomas carregados negativamente (PC:CHOL:PI e PC:CHOL:PG) apresentam resultados satisfatórios de incorporação, como pode ser observado na Figura 2. Este resultado revela-se importante por se saber que lipossomas com carga eléctrica negativa, após administração parenteral, permanecem mais tempo na circulação sanguínea. No que respeita ao uso de lípido com diferente temperatura de transição de fase a comparação pode ser feita observando os resultados obtidos para as formulações lipossomais em que se utilizaram PC, HPC e DSPC (crescente temperatura de transição de fase) em diferentes proporções com CHOL. Para as formulações com menor proporção de colesterol, o lípido de mais baixa temperatura de transição de fase (PC) revelou os melhores resultados para a incorporação de TFL. No entanto, quando a proporção de colesterol aumenta, o lípido de maior temperatura de transição de fase (DSPC) revelou melhores resultados, embora a diferença não seja significativa, como pode ser observado na Figura 3.

Estabilidade in vitro de duas formulações lipossomais de trifluralina

A preparação das formulações lipossomais para este estudo de estabilidade in vitro, no volume inicial de 4 ml contendo 10 $\mu\text{mol/mL}$ de lípido (PC:PG) na razão molar de 4:1 e 1 $\mu\text{mol/mL}$ (335 $\mu\text{g/mL}$) de TFL, iniciou-se pela adição da TFL ao lípido em clorofórmio, seguindo a evaporação do solvente por arrastamento em fluxo de azoto. A hidratação do filme resultante fez-se pela adição de 400 μl de trealose 0,3 M, agitação e repouso durante 15 minutos, adição de mais 400 μl de trealose 0,3 M, nova agitação e novo período de 10 minutos de repouso e, finalmente pela adição de 3200 μl de trealose

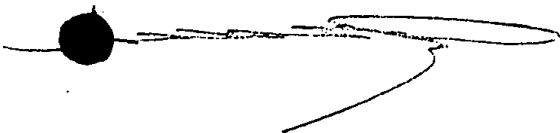


0,3 M. As formulações lipossomais assim obtidas foram dimensionadas por filtrações sucessivas, sob pressão de azoto, por filtros de polycarbonato de poro 5,0, 2,0, 1,0, 0,8, 0,6 e 0,4 μm , com duas passagens no caso deste último (extrusão). A TFL não incorporada, por ser insolúvel em soluções aquosas, cristaliza sob a forma de palhetas e fica retida nestes filtros. Após a extrusão pelo filtro de 0,4 μm , as formulações são divididas em duas partes iguais. Com uma dessas partes continua-se o processo de extrusão, agora por membranas com poros de diâmetros 0,2 e 0,1 μm , com duas passagens no caso deste último. As duas formulações obtidas pelo processo anterior foram mantidas a 4°C e foram retiradas amostras para doseamento de TFL aos dias : 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10, sendo o resultado expresso por comparação com o valor obtido para o dia 0 em percentagem. Imediatamente antes das amostragens as formulações foram observadas ao microscópio para detecção de cristais que, a existirem seriam removidos por centrifugação.

Como se pode observar na **Figura 4**, as duas formulações lipossomais (VET400 e VET100) são estáveis, após hidratação, sendo de 100% a estabilidade durante as primeiras 48 horas. A experiência realizou-se em triplicado, sendo os valores apresentados, a mediana dos resultados obtidos para cada ponto.

Estabilidade em armazenamento de três formulações lipossomais de trifluralina

A preparação das formulações lipossomais para este estudo de estabilidade in vitro, no volume inicial de 45 ml contendo 10 $\mu\text{mol/mL}$ de lípido (DOPC:DOPG) na razão molar de 7 : 3 e 1 $\mu\text{mol/mL}$ (335 $\mu\text{g/mL}$) de TFL, iniciou-se pela adição da TFL ao lípido em clorofórmio, seguindo a evaporação do solvente por arrastamento em fluxo de azoto. A hidratação do filme resultante fez-se pela adição de 4,5 ml de trealose 0,3 M, agitação e repouso durante 30 minutos, adição de mais 4,5 ml de trealose 0,3 M, nova agitação e novo período de 15 minutos de repouso e, finalmente pela adição de 36 ml de trealose 0,3 M. As formulações lipossomais assim obtidas foram dimensionadas por filtrações sucessivas, sob pressão de azoto, por filtros de polycarbonato de poro 5,0, 2,0, 1,0, 0,8, 0,6 e 0,4 μm , com duas passagens no caso deste último (extrusão). A TFL não incorporada, por ser insolúvel em soluções aquosas, cristaliza sob a forma de palhetas e fica retida nestes filtros. Após a extrusão pelo filtro de 0,4 μm , as formulações são divididas em duas partes iguais. Com uma dessas partes continua-se o processo de extrusão, agora por




membranas com poros de diâmetros 0,2 e 0,1 μm , com duas passagens no caso deste último. Das duas formulações VET400 e VET100 preparadas de acordo com a técnica descrita, retiraram-se quantidades iguais que se adicionaram, sendo esta mistura das duas formulações anteriores, denominada como formulação lipossomal MIX. As três formulações foram, de seguida, divididas por frascos com 1 mL cada, congeladas a -70°C durante 1H e liofilizadas de um dia para o outro. Concluído o processo de liofilização, os frascos foram fechados, ainda em vácuo, selados com cápsulas de alumínio e colocados em bancada, durante todo o tempo do estudo de estabilidade. Para cada ponto experimental (0, 0,03, 0,07, 0,13, 0,23, 0,47, 0,7, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 12 meses) procedeu-se à abertura de um frasco, por formulação, seguida de hidratação por adição de água desionizada e esterilizada até perfazer um volume de 1 mL. Os frascos contendo as formulações lipossomais agora hidratadas foram deixados em repouso durante 2 horas. As formulações lipossomais foram observadas ao microscópio para verificação da presença de algum precipitado que, a existir seria removido por centrifugação. Procedeu-se à quantificação da trifluralina em cada formulação e expressou-se o resultado em percentagem da trifluralina nas mesmas formulações relativamente ao dia zero (dia em que terminou a liofilização).

Como se pode observar na **Figura 5**, as três formulações lipossomais (VET400, VET100 e MIX) são estáveis, sob a forma liofilizada, apresentando, após um ano de armazenamento seguido de hidratação com água, valores de trifluralina superiores a 90 % do valor inicial. A experiência realizou-se em triplicado, sendo os valores apresentados, a mediana dos resultados obtidos para cada ponto.

Avaliação da toxicidade de dose única

Este estudo foi realizado com uma formulação lipossomal de composição lipídica DOPC:DOPG 7:3 contendo TFL e comparando com uma composição lipossomal igual não contendo TFL (lipossomas vazios).

A preparação da formulação lipossomal, de lipossomas vazios, para este estudo de toxicidade de dose única, no volume inicial de 400 mL contendo 10 $\mu\text{mol/mL}$ de lípido (DOPC:DOPG) na razão molar de 7 : 3, iniciou-se pela medição do lípido em clorofórmio,



seguindo-se a evaporação do solvente em rotavapor e conclusão da secagem por arrastamento em fluxo de azoto. A hidratação do filme resultante fez-se pela adição de 40 ml de sacarose 0,3 M, agitação e repouso durante 30 minutos, adição de mais 40 ml de sacarose 0,3 M, nova agitação e novo período de 15 minutos de repouso e, finalmente pela adição de 320 ml de sacarose 0,3 M. A formulações lipossomal assim obtida foi dimensionada por filtrações sucessivas, sob pressão de azoto, por filtros de policarbonato de poro 5,0, 2,0, 1,0, 0,8, 0,6 e 0,4 μm , com duas passagens no caso deste último (extrusão). Após a extrusão, a formulação lipossomal foi submetida a ultracentrifugação a 49000 rpm, durante duas horas, a 15°C. Após a ultracentrifugação, retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso até 35 mL por adição de sacarose 0,3 M.

A preparação da formulação lipossomal contendo TFL obedeceu ao mesmo processo descrito para a preparação vazia, com a TFL a ser adicionada à solução inicial de lípido em clorofórmio. Após a extrusão pelo filtro de 0,4 μm , a formulação foi dividida em duas partes iguais. Com uma dessas partes continua-se o processo de extrusão, agora por membranas com poros de diâmetros 0,2 e 0,1 μm , com duas passagens no caso deste último. As duas formulações VET400 e VET100 preparadas de acordo com a técnica descrita, foram misturadas sendo esta mistura das duas formulações anteriores, denominada como formulação lipossomal MIX. Após a mistura, a formulação lipossomal foi observada ao microscópio para verificação da presença de algum precipitado que, a existir seria removido por uma centrifugação prévia anterior à ultracentrifugação.

A concentração final em lípido foi determinada nas duas formulações e a formulação contendo trifluralina foi ajustada de forma a ambas as formulações terem a mesma concentração em lípido.

A concentração em trifluralina foi determinada na formulação que a continha de forma a conhecer-se também a concentração em trifluralina, após o ajuste referido no parágrafo anterior.

O estudo foi realizado em ratinhos BALB/c machos e fêmeas. As formulações lipossomais foram administradas por duas vias: intraperitoneal (i.p.) e intravenosa (i.v.). As doses administradas foram de 30, 20 e 10 mL/kg para as administrações i.p. e de 10, 5 e 2 mL/kg para as administrações i.v. O número de animais por grupo foi de 5. As doses

administradas correspondem a doses calculadas de lípido (nas duas formulações) e de TFL (na formulação contendo TFL) apresentadas na **Tab la 2**.

Tabela 2 - Doses usadas no estudo de toxicidade de dose única

Dose (mL/Kg)	Lípido (μ mol/Kg)	TFL (mg/Kg)
30	2790	63.9
20	1860	42.6
10	930	21.3
5	465	10.7
2	186	4.3

Para a administração destas doses todos os animais foram pesados e a quantidade de formulação lipossomal foi calculada de acordo com o objectivo em mL/kg e tendo em conta o peso de cada animal. Foi, ainda, injectado um grupo de animais controle com sacarose 0,3 M.

Após administração os animais foram observados a intervalos regulares, durante 48 horas, para detecção de alterações de comportamento. Após este período de tempo, os animais foram sacrificados, pesados e retirados, de cada animal, o coração, baço, fígado e rins, para pesagem e observação de alterações macroscópicas. Além destes valores determinou-se também o peso relativo dos referidos órgãos, definido como a razão peso do órgão/peso do animal. Os resultados obtidos são apresentados nas **Tabelas 3 a 20**.

Tabela 3 - Peso corporal absoluto (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	3,91E+01	2,93E+01	3,69E+01	2,78E+01
	desvio padrão	3,67E+00	1,61E+00	1,94E+00	1,02E+00
2	média	3,75E+01	2,92E+01		
	desvio padrão	1,42E+00	1,99E+00		
5	média	3,80E+01	2,76E+01		
	desvio padrão	2,73E+00	8,12E-01		
10	média	3,67E+01	2,92E+01	3,75E+01	2,73E+01
	desvio padrão	9,15E-01	1,73E+00	1,45E+00	1,33E+00
20	média			3,55E+01	2,92E+01
	desvio padrão			4,60E+00	2,91E+00
30	média			3,48E+01	2,94E+01
	desvio padrão			1,52E+00	1,60E+00

Tabela 4 - Peso do coração absoluto (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	1,70E-01	1,42E-01	2,07E-01	1,44E-01
	desvio padrão	2,55E-02	5,20E-03	2,38E-02	2,13E-02
2	média	1,87E-01	1,55E-01		
	desvio padrão	8,81E-03	1,67E-02		
5	média	1,85E-01	1,37E-01		
	desvio padrão	1,95E-02	2,09E-02		
10	média	1,96E-01	1,50E-01	2,11E-01	1,33E-01
	desvio padrão	3,68E-02	6,17E-03	3,63E-02	2,15E-02
20	média			2,15E-01	1,34E-01
	desvio padrão			3,04E-02	1,07E-02
30	média			1,92E-01	1,49E-01
	desvio padrão			1,18E-02	2,47E-02

Tabela 5 - Peso do fígado absoluto (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	1,72E+00	1,31E+00	1,89E+00	1,07E+00
	desvio padrão	2,08E-01	4,25E-02	2,07E-01	9,86E-02
2	média	1,72E+00	1,24E+00		
	desvio padrão	7,32E-02	1,39E-01		
5	média	1,62E+00	1,12E+00		
	desvio padrão	1,74E-01	8,91E-02		
10	média	1,68E+00	1,21E+00	1,96E+00	1,06E+00
	desvio padrão	8,40E-02	1,40E-01	1,14E-01	7,88E-02
20	média			1,95E+00	1,20E+00
	desvio padrão			1,12E-01	1,68E-01
30	média			1,58E+00	1,19E+00
	desvio padrão			1,25E-01	1,40E-01

Tabela 6 - Peso do baço absoluto (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	1,03E-01	9,46E-02	1,26E-01	1,04E-01
	desvio padrão	1,08E-02	5,36E-02	2,51E-02	2,66E-02
2	média	1,10E-01	9,86E-02		
	desvio padrão	1,51E-02	4,86E-02		
5	média	1,21E-01	7,60E-02		
	desvio padrão	9,11E-03	2,53E-02		
10	média	1,16E-01	1,07E-01	1,06E-01	7,46E-02
	desvio padrão	1,14E-02	2,55E-02	8,21E-03	2,36E-02
20	média			1,27E-01	1,01E-01
	desvio padrão			1,88E-02	1,88E-02
30	média			1,08E-01	8,97E-02
	desvio padrão			8,35E-03	1,86E-02

Tabela 7 - Peso dos rins absoluto (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	6,37E-01	3,64E-01	6,22E-01	3,11E-01
	desvio padrão	7,83E-02	2,62E-02	5,57E-02	4,00E-02
2	média	6,13E-01	3,63E-01		
	desvio padrão	6,42E-02	2,76E-02		
5	média	6,46E-01	3,20E-01		
	desvio padrão	1,11E-01	4,23E-02		
10	média	6,63E-01	3,99E-01	6,02E-01	2,95E-01
	desvio padrão	6,17E-02	4,82E-02	6,61E-02	2,20E-02
20	média			5,24E-01	3,00E-01
	desvio padrão			2,62E-01	1,80E-02
30	média			6,29E-01	3,17E-01
	desvio padrão			6,37E-02	2,64E-02

Tabela 8 - Peso corporal absoluto (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	2,61E+01	2,06E+01	2,64E+01	1,96E+01
	desvio padrão	1,42E+00	1,13E+00	1,82E+00	1,93E+00
2	média	2,52E+01	1,89E+01		
	desvio padrão	7,53E-01	1,28E+00		
5	média	2,58E+01	1,97E+01		
	desvio padrão	1,99E+00	7,31E-01		
10	média	2,62E+01	2,01E+01	2,45E+01	2,05E+01
	desvio padrão	1,32E+00	9,32E-01	1,79E+00	1,60E+00
20	média			2,71E+01	2,07E+01
	desvio padrão			2,32E+00	6,96E-01
30	média			1,96E+01	2,02E+01
	desvio padrão			1,93E+00	2,67E+00

Tab la 9 - Peso do coração absoluto (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	1,43E-01	1,08E-01	1,38E-01	9,60E-02
	desvio padrão	1,28E-02	1,10E-02	1,92E-02	8,98E-03
2	média	1,39E-01	1,05E-01		
	desvio padrão	9,49E-03	1,18E-02		
5	média	1,37E-01	1,14E-01		
	desvio padrão	7,03E-03	8,61E-03		
10	média	1,54E-01	1,04E-01	1,30E-01	9,65E-02
	desvio padrão	9,80E-03	1,48E-02	1,56E-02	9,46E-03
20	média			1,57E-01	1,05E-01
	desvio padrão			3,50E-02	5,74E-03
30	média			1,34E-01	9,62E-02
	desvio padrão			1,55E-02	1,17E-02

Tabela 10 - Peso do fígado absoluto (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	1,32E+00	9,71E-01	1,19E+00	8,80E-01
	desvio padrão	5,16E-02	8,62E-02	7,82E-02	1,10E-01
2	média	1,20E+00	9,63E-01		
	desvio padrão	1,21E-01	8,88E-02		
5	média	1,31E+00	9,79E-01		
	desvio padrão	1,76E-01	2,86E-02		
10	média	1,17E+00	1,00E+00	1,21E+00	1,01E+00
	desvio padrão	6,32E-01	5,03E-02	1,40E-01	8,45E-02
20	média			1,40E+00	9,97E-01
	desvio padrão			1,30E-01	6,59E-02
30	média			1,27E+00	9,19E-01
	desvio padrão			1,48E-01	1,73E-01

Tab la 11 - Peso do baço absoluto (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	9,02E-02	8,52E-02	8,25E-02	7,66E-02
	desvio padrão	5,55E-03	8,24E-03	3,97E-03	1,75E-02
2	média	8,65E-02	7,98E-02		
	desvio padrão	1,28E-02	8,21E-03		
5	média	9,47E-02	9,41E-02		
	desvio padrão	2,51E-02	4,85E-03		
10	média	1,02E-01	9,16E-02	9,52E-02	9,05E-02
	desvio padrão	2,24E-02	6,22E-03	7,56E-03	8,78E-03
20	média			9,45E-02	9,65E-02
	desvio padrão			8,13E-03	5,22E-03
30	média			1,10E-01	8,72E-02
	desvio padrão			4,03E-02	1,58E-02

Tabela 12 - Peso dos rins absoluto (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	3,86E-01	2,32E-01	3,56E-01	2,21E-01
	desvio padrão	3,53E-02	2,41E-02	2,80E-02	3,16E-02
2	média	3,52E-01	2,13E-01		
	desvio padrão	1,30E-02	1,98E-02		
5	média	3,62E-01	2,15E-01		
	desvio padrão	4,37E-02	4,90E-02		
10	média	3,90E-01	2,25E-01	3,36E-01	2,17E-01
	desvio padrão	2,35E-02	1,92E-02	3,23E-02	2,46E-02
20	média			3,61E-01	2,38E-01
	desvio padrão			4,23E-02	1,88E-02
30	média			3,48E-01	2,14E-01
	desvio padrão			2,94E-02	1,76E-02

Tabela 13 - Peso relativo do coração (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	4,35E-03	4,88E-03	5,61E-03	5,18E-03
	desvio padrão	4,87E-04	3,60E-04	7,34E-04	7,66E-04
2	média	4,99E-03	5,31E-03		
	desvio padrão	1,62E-04	2,77E-04		
5	média	4,88E-03	4,96E-03		
	desvio padrão	5,63E-04	8,06E-04		
10	média	4,88E-03	5,16E-03	5,61E-03	4,91E-03
	desvio padrão	3,60E-04	3,89E-04	9,03E-04	8,90E-04
20	média			6,08E-03	4,61E-03
	desvio padrão			8,16E-04	4,65E-04
30	média			5,52E-03	5,07E-03
	desvio padrão			2,82E-04	8,75E-04

Tabela 14 - Peso relativo do fígado (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	4,39E-02	4,48E-02	5,12E-02	3,87E-02
	desvio padrão	1,45E-03	2,38E-03	4,75E-03	3,30E-03
2	média	4,58E-02	4,27E-02		
	desvio padrão	2,02E-03	2,84E-03		
5	média	4,27E-02	4,07E-02		
	desvio padrão	3,10E-03	2,43E-03		
10	média	4,58E-02	4,14E-02	5,24E-02	3,86E-02
	desvio padrão	2,98E-03	3,03E-03	3,36E-03	1,43E-03
20	média			5,59E-02	4,09E-02
	desvio padrão			9,62E-03	3,32E-03
30	média			4,53E-02	4,04E-02
	desvio padrão			2,71E-03	4,22E-03

Tab la 15 - Peso relativo do baço (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	2,65E-03	3,29E-03	3,42E-03	3,75E-03
	desvio padrão	3,51E-04	1,95E-03	6,65E-04	9,22E-04
2	média	2,94E-03	3,33E-03		
	desvio padrão	4,13E-04	1,59E-03		
5	média	3,19E-03	2,75E-03		
	desvio padrão	2,49E-05	9,28E-04		
10	média	3,18E-03	3,67E-03	2,81E-03	2,74E-03
	desvio padrão	3,57E-04	7,30E-04	1,26E-04	8,96E-04
20	média			3,66E-03	3,46E-03
	desvio padrão			9,83E-04	4,51E-04
30	média			3,11E-03	3,05E-03
	desvio padrão			1,42E-04	6,26E-04

Tabela 16 - Peso relativo dos rins (lipossomas vazios)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	1,63E-02	1,24E-02	1,69E-02	1,12E-02
	desvio padrão	1,36E-03	4,49E-04	1,81E-03	1,12E-03
2	média	1,63E-02	1,25E-02		
	desvio padrão	1,27E-03	3,47E-04		
5	média	1,69E-02	1,16E-02		
	desvio padrão	2,22E-03	1,64E-03		
10	média	1,81E-02	1,37E-02	1,60E-02	1,08E-02
	desvio padrão	1,79E-03	1,53E-03	1,50E-03	1,16E-03
20	média			1,52E-02	1,03E-02
	desvio padrão			8,41E-03	6,26E-04
30	média			1,81E-02	1,08E-02
	desvio padrão			1,51E-03	1,10E-03

Tab la 17 - Peso relativo do coração (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	5,49E-03	5,27E-03	5,25E-03	4,90E-03
	desvio padrão	4,52E-04	5,20E-04	7,39E-04	1,97E-04
2	média	5,50E-03	5,56E-03		
	desvio padrão	4,97E-04	7,85E-04		
5	média	5,35E-03	5,79E-03		
	desvio padrão	5,73E-04	5,42E-04		
10	média	5,90E-03	5,20E-03	5,28E-03	4,70E-03
	desvio padrão	5,87E-04	7,05E-04	3,02E-04	2,23E-04
20	média			5,77E-03	5,07E-03
	desvio padrão			1,04E-03	2,44E-04
30	média			5,19E-03	4,79E-03
	desvio padrão			4,46E-04	3,87E-04

Tabela 18 - Peso relativo do fígado (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	5,07E-02	4,72E-02	4,50E-02	4,48E-02
	desvio padrão	3,17E-03	3,28E-03	2,38E-03	1,82E-03
2	média	4,77E-02	5,09E-02		
	desvio padrão	4,03E-03	3,25E-03		
5	média	5,06E-02	4,98E-02		
	desvio padrão	4,96E-03	1,78E-03		
10	média	4,43E-02	4,99E-02	4,93E-02	4,93E-02
	desvio padrão	2,34E-02	2,75E-03	4,63E-03	1,43E-03
20	média			5,15E-02	4,81E-02
	desvio padrão			1,31E-03	1,96E-03
30	média			4,93E-02	4,53E-02
	desvio padrão			3,60E-03	2,70E-03

Tabela 19 - Peso relativo do baço (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	3,47E-03	4,15E-03	3,13E-03	3,87E-03
	desvio padrão	2,14E-04	3,94E-04	1,04E-04	6,85E-04
2	média	3,42E-03	4,22E-03		
	desvio padrão	4,35E-04	3,83E-04		
5	média	3,65E-03	4,78E-03		
	desvio padrão	8,45E-04	1,91E-04		
10	média	3,86E-03	4,57E-03	3,90E-03	4,41E-03
	desvio padrão	6,87E-04	2,34E-04	4,63E-04	1,18E-04
20	média			3,49E-03	4,66E-03
	desvio padrão			2,25E-04	2,21E-04
30	média			4,24E-03	4,32E-03
	desvio padrão			1,33E-03	4,76E-04

Tabela 20 - Peso relativo dos rins (lipossomas com TFL)

Dose (mL/Kg)		Vias de Administração			
		i.v.		i.p.	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle	média	1,48E-02	1,13E-02	1,35E-02	1,12E-02
	desvio padrão	1,28E-03	5,42E-04	1,03E-03	5,59E-04
2	média	1,40E-02	1,12E-02		
	desvio padrão	8,36E-04	5,44E-04		
5	média	1,40E-02	1,09E-02		
	desvio padrão	1,19E-03	2,57E-03		
10	média	1,49E-02	1,12E-02	1,37E-02	1,06E-02
	desvio padrão	6,29E-04	6,70E-04	6,60E-04	7,15E-04
20	média			1,33E-02	1,15E-02
	desvio padrão			8,20E-04	5,48E-04
30	média			1,35E-02	1,07E-02
	desvio padrão			8,32E-04	7,50E-04

Os valores obtidos foram tratados estatisticamente para a significância das variações ($p=0,005$). Foram comparados os resultados obtidos de pesos absolutos das duas formulações (animal inteiro e órgãos) entre si e com os pesos absolutos do grupo controle, pesos relativos das duas formulações (órgãos) entre si e com os pesos relativos do grupo controle. Da análise estatística concluiu-se não existir toxicidade para qualquer dose de qualquer das duas formulações injectadas.

Avaliação da actividade biológica

De modo a avaliar a actividade biológica de formulações lipossomais de TFL preparadas de acordo com a presente invenção, seleccionou-se um modelo animal de leishmaniose. Ratinhos BALB/c foram infectados com 2×10^7 (i.v.) parasitas da estirpe LV9 (*Leishmania donovani*), cedida pela London School of Hygiene and Tropical Medicine. Os grupos (5 animais por grupo) e esquemas de tratamento podem ser observados na Tabela 21.

Tabela 21 – Actividade Biológica

Composição Lipídica das Formulações	Dose (mg TFL/kg)	Nº Doses	% de inibição
DOPC:DOPG 7:3	15	5	62
		3	17
		1	80
DSPC:CHOL 4:1	15	5	53
		3	92
		1	91
PC:PG 4:1	15	5	47
		3	88
		1	60
PC:CHOL:PI 3.7:1:0,3	5	5	57
		3	52
		1	68
PC:CHOL:DSPE-PEG (2000) 3.7:1:0,3	4	5	75
		3	74
DOPC:DOPG 7:3 (dialisados)	0,6	5	86

Os tratamentos iniciaram-se 7 dias após a infecção e os animais foram sacrificados 15 dias após a infecção. A cada animal foi retirado e pesado o fígado, após o que se realizou a contagem de amastigotos nesse órgão, recorrendo à impressão de lâminas e ao cálculo dessa infecção através de uma equação matemática apropriada. Os resultados obtidos estão expressos na **Tabela 21**.

A primeira conclusão é que devido à incorporação lipossomal da TFL, pode-se pela primeira vez realizar a administração parentérica de TFL.

Todas as formulações lipossomais de TFL foram capazes de reduzir a infecção neste modelo.

Lisboa, 21 de Agosto de 1998

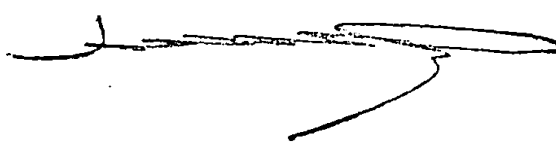
AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and horizontal strokes, positioned below the text 'AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL'.



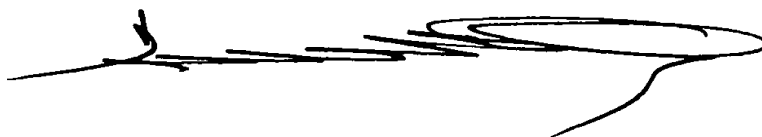
REIVINDICAÇÕES

1. Formulação lipossomal caracterizada pelo facto de conter uma dinitroanilina incorporada ou encapsulada.
2. Formulação lipossomal de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo facto de a dinitroanilina ser a trifluralina.
3. Formulação lipossomal de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2, caracterizada por o diâmetro dos lipossomas variar de 0,01 μm a 50 μm .
4. Formulação lipossomal de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo facto de se misturarem populações de partículas de diferente diâmetro.
5. Formulação lipossomal de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizada por ser constituída por uma mistura de populações lipossomais de diâmetros respectivamente, superior e inferior a 100 nm.
6. Formulações lipossomais de acordo com qualquer das reivindicações precedentes, caracterizadas por conterem qualquer dos seguintes lípidos, hidrogenados ou não, individualmente ou em misturas, em qualquer razão molar: diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina (PC), colesterol (Chol) ou seus derivados, esfingomiéline (SM), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), fosfatidilglicerol (PG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), gangliósidos, ceramidas, fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), dicetilfosfato (DcP), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), estearilamina (SA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e outros lípidos sintéticos.
7. Processo para a preparação de uma formulação lipossomal contendo uma dinitroanilina, caracterizado por:
obter-se uma formulação lipossomal contendo uma dinitroanilina por hidratação a partir de um filme lipídico contendo a dinitroanilina;
liofilizar-se a formulação lipossomal da dinitroanilina; reidratar-se a formulação lipossomal liofilizada.

- 
8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por compreender ainda um passo de dimensionamento da formulação lipossomal da dinitroanilina para redução do diâmetro das vesículas, passo este executado anteriormente ao passo de liofilização.
 9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o dimensionamento ser executado por extrusão sob pressão em membranas porosas.
 10. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 9, caracterizado por a hidratação ser realizada numa primeira fase, por adição de um pequeno volume de uma solução aquosa seguida, após uma fase de repouso, pela adição do restante volume de solução aquosa.
 11. Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se utilizar nas fases de hidratação uma solução não salina.
 12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a fase de reidratação ser realizada com soluções de sacarose, trealose, glucose ou com qualquer outra solução açucarada.
 13. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 12, caracterizado pelo facto de se misturarem populações de partículas de diferente diâmetro.
 14. Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de se misturarem partículas que após dimensionamento, apresentem populações de diâmetro, respectivamente, superior e inferior a 100 nm.
 15. Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de o dimensionamento das diferentes populações ser realizado de acordo com a reivindicação 9.
 16. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 9 ou 13 a 15, caracterizado pelo facto de a hidratação ser efectuada de acordo com a reivindicação 10.

17. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 10 e 13 a 16, caracterizado pelo facto de se utilizar na fase de hidratação uma solução de acordo com a reivindicação 11.
18. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 11 e 13 a 17 caracterizado pelo facto de serem utilizadas soluções de acordo com a reivindicação 12.
19. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 18, caracterizado pelo uso de qualquer dos seguintes lípidos, hidrogenados ou não, individualmente ou em misturas, em qualquer razão molar diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina (PC), colesterol (Chol) ou seus derivados, esfingomiéline (SM), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), fosfatidilglicerol (PG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), gangliósidos, ceramidas, fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), dicetilfosfato (DcP), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), estearilamina (SA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e outros lípidos sintéticos.
20. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 19, caracterizado pelo facto de a dinitroanilina ser a trifluralina.
21. Formulações lipossomais de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, quando preparadas por um processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 20.
22. Utilização das formulações lipossomais, para o tratamento de infecções em humanos ou animais, caracterizada por se usar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma formulação lipossomal de uma dinitroanilina de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6 e 21.

Lisboa, 21 de Agosto de 1998
AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



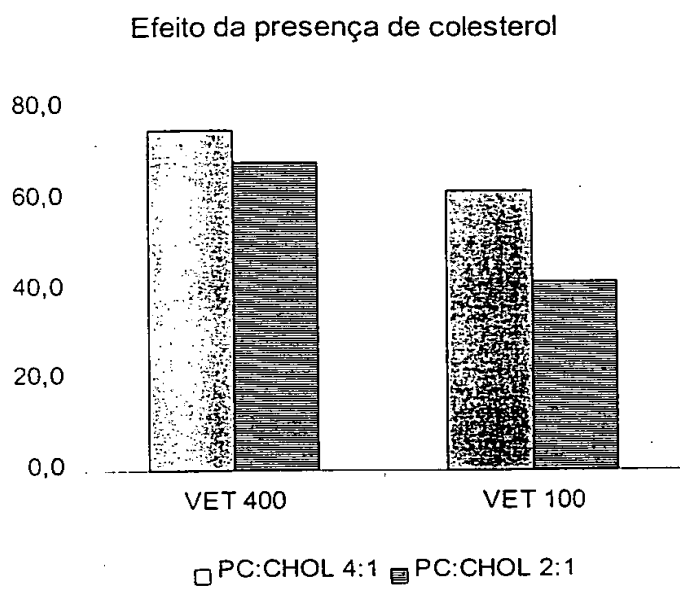


Figura 1

Efeito da presença de cargas eléctricas na membrana lípidica

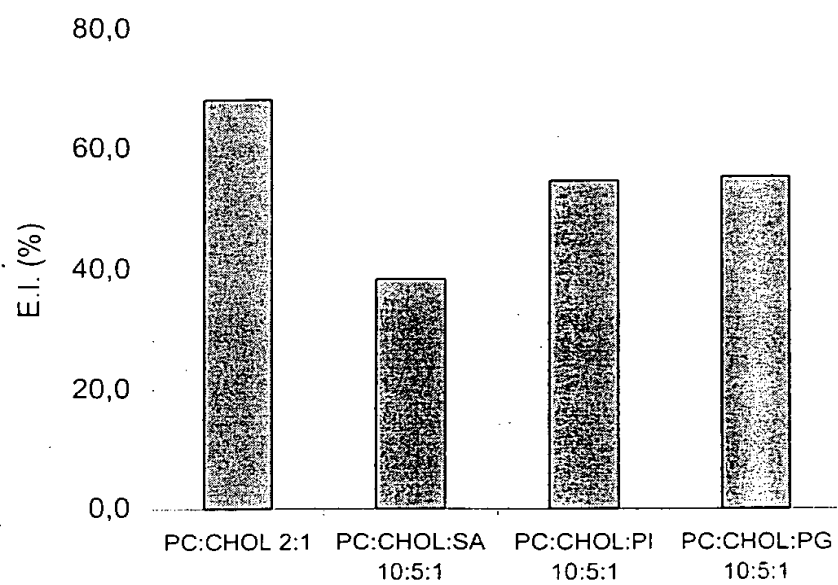


Figura 2

Efeito de lípido com diferente temperatura de transição de fase

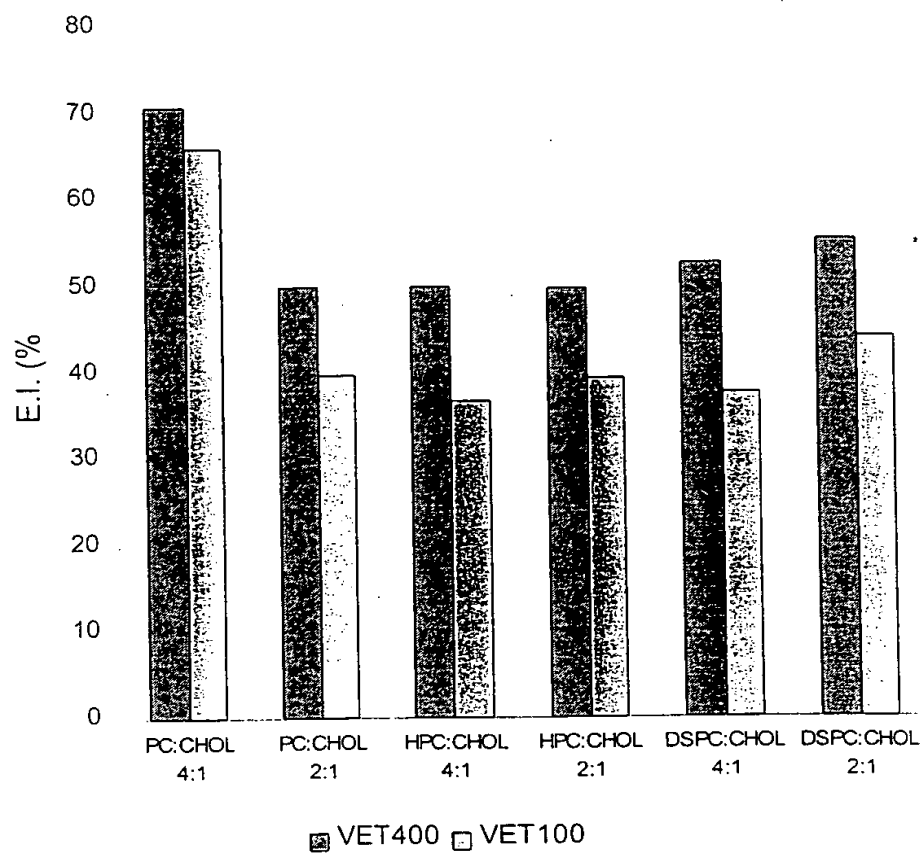


Figura 3

Estabilidade *in vitro* de duas formulações de PC:PG 4:1.

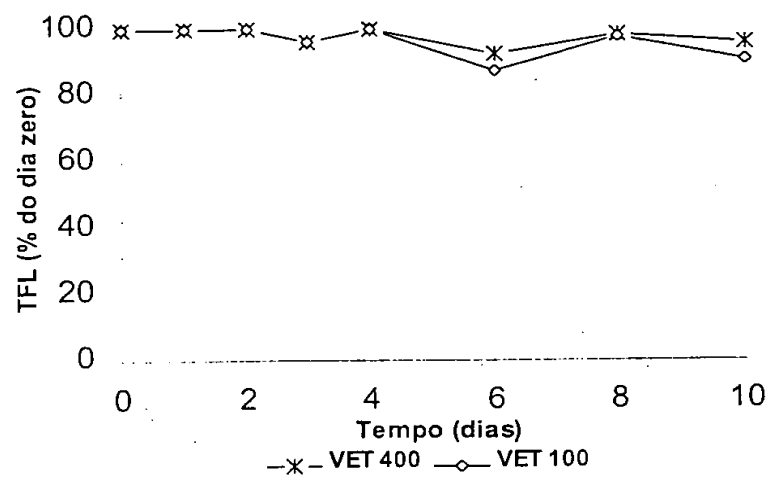


Figura 4

Estabilidade em armazenamento de três formulações de DOPC:DOPG 7:3

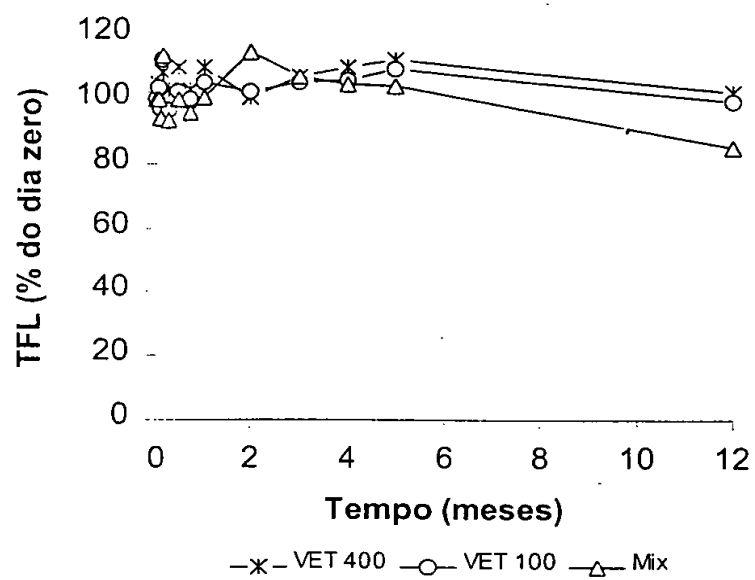


Figura 5